

STAPHYLOKOKKEN — KOAGULASE

MEIKE WOHLERS

1970

Aus der 1. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk

STAPHYLOKOKKEN — KOAGULASE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität
zu München

vorgelegt von

Meike WOHLERS

Nordenham

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München



Referent: Professor Dr. R. Marx
Correferent: Professor Dr. H. Schwiegk
Dekan: Professor Dr. E. Kraft
Tag der mündlichen Prüfung: 9.6.1970

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B. GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG	2
C. BEZIEHUNG DER PLASMA - KOAGULASE - REAKTION ZUR PATHOGENITÄT DER STAPHYLOKOKKEN. FAKTOREN, DIE DEN AUSFALL DER REAKTION BEEINFLUSSEN.	4
D. REINIGUNG DER KOAGULASE	6
E. EIGENSCHAFTEN DER KOAGULASE	8
F. DER AKTIVATOR: EIGENSCHAFTEN UND VERGLEICH MIT PROTHROMBIN	12
G. ENZYMATISCHE WIRKUNGEN VON KOAGULASE PLUS AKTIVATOR	18
H. BEDEUTUNG DER KOAGULASE	21
J. PRODUKTION DER KOAGULASE	26
K. ZUSAMMENFASSUNG	29
L. LITERATURVERZEICHNIS	30

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Bei der physiologischen Blutgerinnung wird Prothrombin in Thrombin umgewandelt, und Thrombin katalysiert dann die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin.

Seitdem man weiß, daß Gerinnung auch von einigen Staphylokokken-Stämmen verursacht werden kann, die Koagulase produzieren, wird über die Wirkungsweise der Koagulase gearbeitet.

Der erste Untersucher glaubte, daß es sich bei ihr um eine Substanz handle, die ähnlich der Thrombokinase wirke. Anderen Autoren zufolge zeigt sie Eigenschaften, die sie eher mit Thrombin als mit der Thrombokinase in eine Reihe stellen. Spätere Autoren halten das St.-Ferment weder für eine Thrombokinase noch für Thrombin, da die Koagulase im Gegensatz zu Thrombin eine relativ beträchtliche Thermostabilität besitzt.

1944 fand man dann, daß die von den St. gebildete Substanz die Gerinnung nicht selbständig verursacht, sondern dazu einen Aktivator benötigt, über dessen Natur aber noch nichts gesagt werden konnte.

Heute versucht man, eine Beziehung zwischen Aktivator und Prothrombin herzustellen und zu klären, ob diese beiden Substanzen identisch seien.

In der vorliegenden Arbeit sollen Wirkungsweise der Koagulase - in vivo und in vitro - und die Frage der Identität von Aktivator und Prothrombin behandelt werden.

B. GESCHICHTLICHE ENTWICKLUNG

1903 entdeckte LOEB bei seinen Untersuchungen über den Einfluß einiger Bakterien auf die Blutgerinnung die Koagulierung von Gänseplasma durch *Staphylococcus pyogenes aureus*. MUCH (1908) stellte dann als erster eine Beziehung zwischen der Pathogenität und der Plasmakoagulierung her. Trotz der umfangreichen Untersuchungen von DÁRANYI (1925, 1926, 1927, 1935) und GROSS (1927, 1928, 1931, 1932) konnte sich diese Methode der Pathogenitätsbestimmung nur langsam durchsetzen.

Für die Wirkung der Koagulase ist die Wahl des Plasmas entscheidend: am besten eignen sich Kaninchen- und Menschenplasma (GROSS 1932). Gerinnungshemmende Substanzen haben keinen Einfluß auf die Reaktion.

Die Frage nach der antigenen Eigenschaft der Koagulase behandelte als erster GROSS (1931), er konnte diese Frage aber nicht klären. LOMINSKI und ROBERTS (1946) verhalten sich zweifelnd, während RAMMELKAMP und MITARB (1950a) und DUTHIE (1952) die antigene Eigenschaft bestätigen.

Weitgehende Reinigung der Koagulase erzielte als erster TAGER (1948). Sein Gerinnungsstoff war 300-mal reiner als das Ausgangsprodukt. DUTHIE und LORENZ (1952), JACHERTS (1956), BLOBEL und BERMAN (1960) beschäftigten sich ebenfalls mit diesem Problem. ZOLLI (1963) erreichte extreme Reinigung: die Aktivität der Koagulase stieg auf das 3700-fache pro mgr Protein.

1944 fanden SMITH und HALE, daß die Wirkung der Koagulase von der Anwesenheit eines Aktivators abhängt. Dieser Faktor wird als "Coagulase - Reacting - Factor" (C.R.F.) oder als "Serum - co - factor" bezeichnet.

Als beste Quelle für den Aktivator sahen GERHEIM und FERGUSON (1947) die Albumine an, während TAGER (1948) eine Ähnlichkeit zwischen Prothrombin und Aktivator feststellte.

Über die Wirkungsweise der Koagulase war lange Zeit nichts bekannt. GROSS (1932) konnte in einer - allerdings abgebundenen - Jugularvene eines Kaninchens mit Hilfe der Koagulase einen echten Thrombus erzeugen. SMITH und JOHNSTONE (1956, 1958), BLOBEL und BERMAN (1961) erzielten durch Koagulase-Injektionen einen Abfall der Fibrinogenwerte. Andere Autoren sehen in der Koagulaseproduktion einen Schutz vor der Phagocytose (SMITH und HALE 1947), EKSTEDT und YOTIS (1960) dagegen einen Schutz der Koagulase-positiven St. vor dem antibakteriellen Serumfaktor. K.-negative St. konnten durch Zugabe von Koagulase zum Wachstum angeregt werden.

C. BEZIEHUNG DER PLASMA-KOAGULASE-REAKTION ZUR
PATHOGENITÄT DER STAPHYLOKOKKEN. FAKTOREN, DIE
DEN AUSFALL DER REAKTION BEEINFLUSSEN.

Da die Staphylokokken die am meisten verbreiteten Mikroorganismen in der Umgebung des Menschen sind, muß sehr oft festgestellt werden, ob gefundene St. Krankheitserreger sind oder nicht.

MUCH (1908) benutzte als erster die Koagulierung des Plasmas durch St. zur Differenzierung von pathogenen und apathogenen St. Er fand nur bei pyogenen Aureus-Stämmen die Fähigkeit zur Gerinnung, nicht aber bei Albus- und Citreus-Stämmen. Die einzelnen Aureus-Stämme unterschieden sich durch verschiedene Gerinnungszeiten. In den Untersuchungen von KLEINSCHMIDT (1909) zeigte auch ein Stamm von St.-albus im Pferdeplasma die Plasma-Koagulase-Reaktion (Pl.-K.-R.), allerdings erst längere Zeit nach der Einsaat. DARANYI (1926), GROSS (1927) und KEMKES (1928) sahen ebenfalls in der Plasmagerinnung eine geeignete Virulenzprüfungsmethode, da diese Fermentreaktion für die pathogenen Aureus-Stämme charakteristisch ist. DARANYI unterschied nicht mehr hämolytische und anhämolysitisch St., woraus man - bis zu diesem Zeitpunkt - einen gewissen Schluß auf die Pathogenität gezogen hatte.

Auch heute gehört die Koagulasereaktion noch zu den üblichen Pathogenitätstests, da sie zuverlässig und technisch unkompliziert ist.

Die koagulierende Wirkung der St. hängt von der Herkunft des Plasmas ab. Pathogene St. koagulieren zwar das Plasma der meisten Warmblütler, doch sind die Gerinnungszeiten bei gleicher Keimeinsaat recht unterschiedlich. Auch innerhalb derselben Plasmaart

kommen verschiedene Gerinnungszeiten vor. Nach den Untersuchungen von GROSS (1933) beträgt die Koagulierungszeit in Kaninchenplasma etwa 1-2 Stunden, während sie in Pferdeplasma erst nach 2 Std. und in Rinderplasma sogar erst nach 24 Std. beginnt. Verschiedene Menschenplasmen werden schon nach 1-2 Std., andere erst nach 4-5 Std. und einige gar nicht koaguliert. Ein eigenartiges Bild zeigt Meer-schweinchen-Plasma, das nur von wenigen Staphylokokken-Stämmen koaguliert wird, und bei dem die Gerinnung bei 37° C unterbleibt, bei 20° C dagegen eintritt, (SMITH und HALE 1944). Schon Zugabe von wenig Menschenplasma bewirkte die Koagulierung des Plasmas durch alle Stämme. ILLES (1963) fand, daß von 50 Stämmen, die mit Humanplasma positive Pl.-K.-R. gaben, nur 38 auch Rinderplasma koagulierten. Nach Zugabe von Menschenplasma kam es auch bei den restlichen 12 zur Gerinnung.

In der Praxis hat sich zur Durchführung des Pathogenitätstests Kaninchenplasma bewährt, auch Menschenplasma ist geeignet.

Den geringsten Einfluß auf den Ausfall der Pl.-K.-R. hat die Wahl der gerinnungshemmenden Substanzen. Natrium-Citrat, Natrium-Oxalat, Heparin und Hirudin zeigen keine nachteilige Wirkung. Auch die Konzentration spielt keine wesentliche Rolle. Zum Beispiel genügen schon Mengen von 1 ‰ Na-Oxalat, um die physiologische Gerinnung zu verhindern. Die Koagulase-reaktion dagegen wird selbst durch einen Zusatz von 8 ‰ Citrat nicht gehemmt (LOMINSKI und ROBERTS 1946), und sogar Heparin in einer Konzentration von 25 ‰ hat keinen Einfluß (RIGDON 1942).

D. REINIGUNG DER KOAGULASE

Hochgereinigte Koagulase herzustellen war lange Zeit sehr schwierig.

Der erste, der einen deutlichen Erfolg erzielte, war TAGER (1948). Seine Hauptforderung für die Gewinnung gereinigter Koagulase war die Auswahl eines St.-Stammes mit einem hohen Anfangstiter: 1:2560 - 1:10.240. Nur wenige St.-Stämme besitzen diese Leistungsfähigkeit. Er isolierte einen solchen Stamm und führte die Ausfällung der Koagulase mit Acetat-Puffern aus. Verunreinigungen wurden weiter durch Äthanol- und Ammoniumsulfat-Ausfällung beseitigt. Für die Definition seines Ergebnisses benutzte TAGER sowohl die Stickstoff-Bestimmung nach Kjeldahl als auch die Tyrosin-Bestimmung mit der Methode von Folin und Ciocalteu. Auf der Basis der Koagulase-Einheiten pro mgr Tyrosin betrug der Reinigungsfaktor 250, während er bei Zugrundelegung der Stickstoff-Bestimmung 365 betrug. Die Aktivität der gereinigten Koagulase war 1000-mal größer als die der ungereinigten. Elektrophoretisch war sie nicht homogen, sondern es konnten 2 bewegliche Komponenten beobachtet werden.

In den folgenden Jahren wurde wiederholt und auf verschiedene Weise zellfreier Gerinnungsstoff gewonnen:

DUTHIE und LORENZ (1952) benutzten in ihren Untersuchungen über die antigene Eigenschaft der Koagulase teilweise gereinigtes Material, das sie durch Cd-Sulfat Ausfällung und Diälyse gewonnen hatten.

JACHERTS (1956) führte die Reinigung ebenfalls durch Cd-Sulfat Fällung, Dialyse und Gefriertrocknung durch und erzielte eine Koagulaseaktivität, die - je nach

dem Koagulasebildungsvermögen der verwendeten Stämme - noch in Mengen von 3.0 /ml deutlich nachweisbar war.

1960 erreichten BLOBEL und Mitarb. mit ihrer Methode - nämlich durch Säureausfällung, Säulenelektrophorese und Anion-Austausch-Zellulose-Chromatographie - ein ähnliches Ergebnis wie TAGER (1948). Der Reinigungsfaktor auf der Basis der N-Bestimmung betrug 387,5 und die gereinigte Koagulase war ebenfalls elektrophoretisch nicht homogen. Im Gegensatz dazu hatten bereits 1958 DUTHIE und HAUGHTON die Reinigung so weit fortgeführt, daß die Koagulase bei der elektrophoretischen Untersuchung homogen war, allerdings nicht bei der Untersuchung mit der Ultrazentrifuge. Sie fanden dabei ein Molekulargewicht der Koagulase von 44.000.

Vollständig homogene Koagulase konnten erst MURRAY und GOHDES (1960) gewinnen, dabei beobachteten sie eine Sedimentationskonstante von 1, die zu Molekulargewichten im Bereich von 5000 - 10.000 gehört.

Extreme Reinigung der Koagulase, die von St.-Stamm 70 gebildet wurde, erzielte ZOLLI (1963). Die Aktivität stieg auf das 3700-fache pro mgr Protein. Die gereinigte Koagulase, die elektrophoretisch homogen war, enthielt - wie auch in den Untersuchungen der anderen Autoren - 15 % Stickstoff. Angaben über das Molekulargewicht findet man nicht. Dafür gibt 1966 TIRUNARAYANAN, der die Reinigung durch Gelfiltration-Chromatographie ausführte, ein Molekulargewicht von 90.000 an. Seiner Meinung nach kommt das Ergebnis dadurch zustande, daß er keine Säuren- oder Salzausfällung - wie die Autoren vor ihm - benutzte, und er hält es für möglich, daß ihre Ergebnisse durch ein Zerbrechen eines großen Moleküls in kleine Fragmente bewirkt wurden.

E. EIGENSCHAFTEN DER KOAGULASE

Das Temperaturverhalten der Koagulase wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben. Nach GROSS (1931) verträgt sie 1-stündiges Erhitzen auf 90° C, nach JACHERTS (1956) sogar für kurze Zeit 100° C. Diese hohe Thermoresistenz hatte Zweifel an der Fermentnatur der Koagulase erweckt. Daher unterscheidet TAGER (1948) zwischen gereinigter und ungereinigter Koagulase: bei Erhitzen auf 65° C für 30 Minuten verliert gereinigte Koagulase über 90 % ihrer Aktivität, während ungereinigte Erhitzen auf 120° C verträgt.

Effect Of Heat On Purified Coagulase

<u>Sample</u>	<u>Coagulase Titer</u>	<u>per cent of activity</u>
Unheated, 3,75 mg per ml. of dist. HOH	163,840	100
56° C, 30 minutes	40,960	25
65° C, 30 minutes	10,240	6,2
Boiling HOH, 15 min.	- 1,280	0.78
Boiling HOH, 30 min.	640	0.39 (TAGER, 1948)

Unempfindlichkeit der Koagulase gegen pH-Schwankungen im Bereich von 4,5 - 7 gibt TAGER (1948) ebenfalls an. Daß die Koagulase von Pepsin und Trypsin schnell zerstört wird, beschreiben TAGER (1948), DUTHIE und LORENZ (1952) und JACHERTS (1956) übereinstimmend. Dieser Befund deutet daraufhin, daß die Aktivität an α -Aminogruppen gebunden sein könnte.

1954 stellte DUTHIE fest, daß die pathogenen St. zwei Koagulasetypen produzieren: freie und gebundene. Die freie, lösliche Form wird von den St. in das umgebende Milieu abgegeben. Sie wirkt auf Fibrinogen erst durch

Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin und sie ergibt einen positiven Ausfall im Röhrchentest. Die zellständige, gebundene Koagulase dagegen führt Fibrinogen direkt in Fibrin über. Sie wird auch als "clumping - factor" bezeichnet, und sie liegt dem "slide-test" zugrunde (CADNESS und Mitarb. 1943).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnte JACHERTS 1956 nur eine Koagulase der pathogenen St. finden: er benutzte drei auf verschiedene Weise gewonnene Koagulasepräparate: Präparat 1 enthielt freie K. nach Duthie, Präparat 2 und 3 gebundene K. nach Duthie. Jacherts konnte in seinen Untersuchungen keinen Unterschied in der Wirkung dieser Präparate auf Fibrinogenlösungen mit und ohne Aktivator finden. In serologischen Untersuchungen erwiesen sich die Präparate als nicht unterscheidbare Antigene. Spätere Autoren wie KAPRAL (1960) und GORRILL (1966) schließen sich dagegen wieder der Ansicht von Duthie an. Sie unterscheiden wieder freie und gebundene Koagulase und sehen in der gebundenen, die ein Teil der Zellwand ist und direkt auf Fibrinogen wirkt, ebenfalls den Verklumpungsfaktor.

Die Frage nach der antigenen Eigenschaft der Koagulase war lange Zeit ungeklärt:

GROSS (1931) konnte - auch nach Vorbehandlung von Kaninchen mit einem Kulturfiltrat, das den Gerinnungsstoff enthielt - kein Serum mit gerinnungshemmenden Eigenschaften gewinnen.

KAPLAN (1946) und LOMINSKI (1946) verhalten sich in dieser Frage zweifelnd. Lominski fand von 348 untersuchten Sera 212, die einen Hemmungsstoff enthielten, der die Koagulase neutralisierte. Da diese Substanz

relativ hitzestabil war, durch Ammoniumsulfat mit der Globulinfraktion der Serumproteine ausgefällt wurde und spezifisch für das entsprechende Antigen war, sprachen diese Punkte für die Antikörpernatur. Dagegen sprach aber, daß der Antikörper nicht eindeutig als Immunreaktion auf ein Antigen anzusehen war.

Spätere Autoren wie TAGER (1948), RAMMELKAMP (1950), DUTHIE (1952) und BOAKE (1956) sehen die Koagulase als ein Antigen an. Tager gelang es nach Immunisierung von Kaninchen mit gereinigter Koagulase eine erhöhte Neutralisierungsfähigkeit gegen Koagulase zu finden. Auch Rammelkamp fand bei Affen nach Immunisierung mit Koagulase Fähigkeiten, diese zu neutralisieren. Er konnte durch Antikörperbildung drei serologisch verschiedene Koagulase-Formen entdecken, während Duthie durch Immunisierung von Kaninchen drei Formen fand und eine vierte, die nur beim Menschen Antikörper bildet.

Immune Response Of Monkeys To Intramuscular Injections
Of Coagulase Free Of Reacting-Factor!

Monkey no.	Cell-free coagulase injections Day	Units	Anticoagulase Titer
B	0	58	< 25
	1	58	
	3	58	
	10		625
	14	58	
	17	58	
	20		900
C	0		36
	1	214	
	2	214	
	3	214	
	4	214	
	5	214	
	13	214	
	14	214	
	15	214	
	16	214	
	17	214	
	24		1400
	30		900
	40		625
G	0		< 25
	1	125	
	3	125	
	10		278
	14	125	
	17	125	
	22		900

(Rammelkamp und Mitarb. 1950 a)

F. DER AKTIVATOR: EIGENSCHAFTEN UND VERGLEICH MIT PROTHROMBIN

Die von den St. gebildete Substanz bringt nicht selbständig die Gerinnung des Plasmas zustande, sondern benötigt dazu einen zuerst von SMITH und HALE (1944) entdeckten Aktivator, der als "Coagulase-Reacting-Factor" (C.R.F.) oder "Serum-co-factor" bezeichnet wird.

Der Aktivatorgehalt der einzelnen Plasmaarten ist unterschiedlich:

Smith und Hale fanden zum Beispiel hohe Werte im menschlichen und Kaninchenplasma, geringere dagegen in Pferde- und Rinderplasma.

Der Aktivator verträgt nach KAPLAN und SPINK (1948) für 30 min eine Temperatur von 100°C , während er nach den Untersuchungen von TAGER (1948) nur einer Temperatur von 54°C für 30 min. widersteht. ILLES (1966) beschreibt, daß in unverdünntem Humanserum bei 60°C für 30 min eine weitgehende Inaktivierung stattfindet. Der günstigste pH-Wert liegt bei 6 - 9, bei pH 4 und 5 tritt Verlust der Aktivität um 10 % ein, bei pH 10,4 Inaktivierung um 99 %.

Über die Natur des Aktivators liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor:

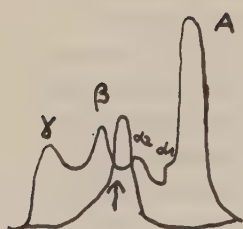
Die Entdecker SMITH und HALE (1944) konnten darüber noch nichts sagen. GERHEIM, FERGUSON und TRAVIS (1947), KAPLAN und SPINK (1948) fanden bei ihren Untersuchungen, daß die Albumine von Serum und Plasma die beste Quelle für C.R.F. seien. Gerheim und Ferguson berichten, daß es in der Abwesenheit von Koagulase durch die Albumine allein nicht zur Gerinnung käme, während

die Globuline - da sie geringe Mengen an Thrombin enthalten - auch ohne Koagulase Gerinnung bewirken könnten. Durch Zugabe von Koagulase zu den Albuminen wurde dort Gerinnung möglich, während die Gerinnung durch die Globuline lediglich etwas verbessert wurde. Im Gegensatz zu diesen beiden Autoren entdeckte TAGER (1948) den Aktivator in der Pseudoglobulinfraktion 1. Die Albumine waren frei an C.R.F.

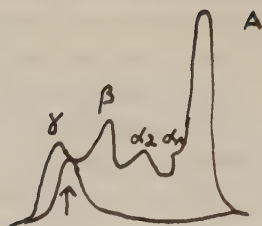
TAGER weist auch als erster auf die Ähnlichkeit zwischen Prothrombin und Aktivator hin. Beide zeigten Hitzeinaktivierung im gleichen Temperaturbereich, beide wurden adsorbiert von BaSO_4 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$ und $\text{Al}(\text{OH})_3$. Dagegen wurde C.R.F. im Gegensatz zu Prothrombin nicht bei Verwendung eines Seitz-Filters adsorbiert.

Auch DUTHIE und LORENZ (1952) beschreiben die Ähnlichkeit Aktivator - Prothrombin: Tiere, die mit Dikumarol vergiftet waren, zeigten sowohl eine Abnahme an Aktivator als auch an Prothrombin. Da der Co-Faktor durch einen Seitz-Filter nicht adsorbiert wurde, nahmen sie an, daß Prothrombin nicht tatsächlich entfernt wurde, sondern daß es in seiner Struktur so verändert war, daß eine Umwandlung in Thrombin nicht mehr möglich war.

In späteren Untersuchungen von TAGER (1956) über die Identität C.R.F. - Prothrombin fand er den Aktivator mit Hilfe der Papierelektrophorese zwischen β und γ Globulin, Prothrombin dagegen zwischen α_2 und β Globulin.



Seegers Prothrombin



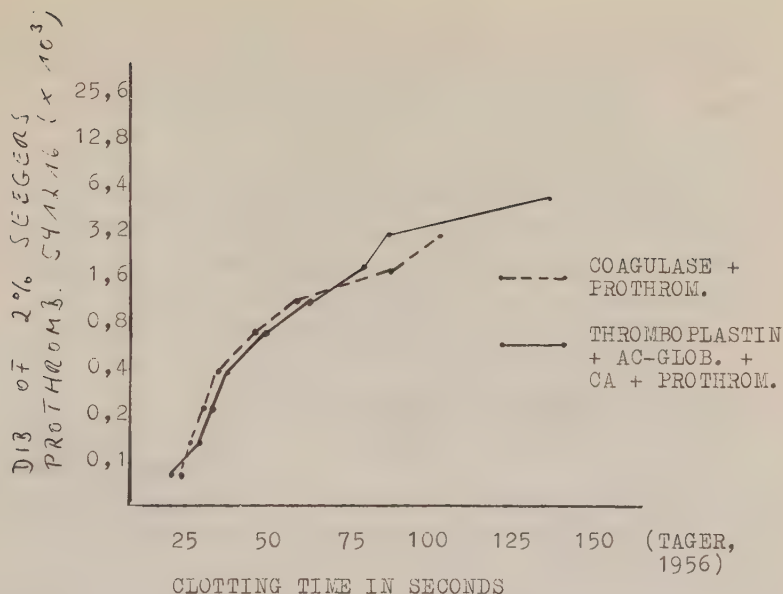
Coagulase-Reacting-Factor

(TAGER, 1956)

Paper electrophoresis of purified CRF and of purified Seegers human Prothrombin, superimposed on human serum, photometer (analytrol) representation. A: albumin peak, α_1 , α_2 , β and γ are the respective globulin peaks.

Bei der Untersuchung mit der Ultrazentrifuge besaß die Hauptkomponente des CRF eine Sedimentationskonstante von 2,5 - 3 und ein dazugehöriges Molekulargewicht von 30.000. Dazu wurde noch eine zwar höhere aber schmalere Komponente gefunden mit einer Konstanten von 6,37 und 6,95 und einem Molekulargewicht von 160.000. Die Hauptkomponente des Prothrombins besaß eine Konstante von 6,2 und 6,38.

Bei der physiologischen Gerinnung fand ein gleicher Verbrauch an Prothrombin und CRF statt. Vitamin K stellte beide Faktoren wieder her. Die Gerinnungszeiten beider Systeme ähnelten sich sehr.



The action of coagulase on purified human prothrombin of Seegers compared to the "physiological" conversion of prothrombin.

Controls: prothrombin 1:100 + fibrinogen, 480 seconds. Prothrombin 1:200 + fibrinogen, 900 seconds. Prothrombin 1:100 + fibrinogen + thromboplastin + calcium, 142 seconds. Prothrombin 1:100 + ac.glob. + fibrinogen, 480 seconds. Ac.glob. + fibrinogen + thromboplastin + calcium, 142 seconds. Coagulase + fibrinogen, 15 minutes.

Diese Ergebnisse veranlaßten Tager folgende Hypothese aufzustellen: die CRF - Aktivität ist ansässig in einigen Teilen des Prothrombinmoleküls, CRF und Prothrombin mögen entweder - wenn das Molekül intakt ist - parallel zueinander laufen; oder aber getrennt, wenn kleinere Einheiten entstanden sind.

HAUGHTON (1959) sah menschliches Prothrombin als Quelle für den Aktivator an. Hochgereinigtes Prothrombin besäße 1000 Einheiten Prothrombin und 160-Aktivator-Einheiten pro mgr Protein.

Auch SOULIER (1966) konnte die Frage, ob Prothrombin und der Aktivator identisch seien, nicht klären. Er fand zwar bei einem Patienten mit angeborener Hypoprothrombinämie (Tabelle I) und in pathologischen Sera Erwachsener folgenden Befund (Tabelle 2):

I) Hypoprothrombinémie congénitale

Date	F,II	C.R.F.	Nature du fibrinogène dans la mixture de dosage C.R.F.
Juin 1965	14,5 %	16,5 %	Fg humain adsorbé
Juin 1966	13 %	14 %	Fg bovin Kabi

II)

Maladies	Taux de facteur II du sérum (% de la normale plasmatique)	Taux de C.R.F. du sérum (% de la normale plasmatique)
Thrombopathie	25	33
Thrombopathie	12,5	12
Hémophilie A	30	27
Thrombopathie	31	35
Thrombopénie	8	9,5
Hémophilie B	46	40
Thrombopathie	14,5	14,5
Hémophilie A	70	70
Thrombopathie	11,5	12,5
Angio-hémophilie	17,6	15,4
Moyenne des 10 malades	26,6	26,8

Taux de facteur II et de C.R.F. dans le sérum de sujets ayant un trouble de la consommation de la prothrombine. (SOULIER 1966)

Bei Kaninchen, die mit Antivitamin K behandelt waren, verringerten sich die Werte von C.R.F. und Prothrombin in der gleichen Weise.

Dagegen zeigten beide Substanzen in Plasmalösungen, die mit verschiedenen Heparin-Konzentrationen versetzt waren, unterschiedliches Verhalten: nur die Prothrombin-Werte wurden durch Heparin vermindert.

<u>Dosage facteur II</u>		<u>Dosage C.R.F.</u>	
<u>T.C.</u> <u>(sec.)</u>	<u>Taux</u> <u>(%)</u>	<u>T.C.</u> <u>(sec.)</u>	<u>Taux</u> <u>(%)</u>
Plasma normal heparine (20 U/ml):			
Dilution 1/10	35	14	36,3
1/20	30	50	44,5
1/40	33,5	66	60

Plasma normal non heparine:			
Dilution 1/10	17,5	100	37
1/20	21	100	45
1/40	29	100	61

Dosages de C.R.F. et de facteur II dans
les plasmas heparines. (SOULIER 1966)

Aus diesen Ergebnissen schloß SOULIER, daß möglicherweise eine inaktive Prothrombinform - nicht zeigbar durch klassische Methoden - durch Staphylokoagulase sichtbar werden könnte.

Auf dem Hamburger Symposium 1969 vertrat Frau Dr. STEINBÜCH - aus dem Arbeitskreis um SOULIER, Paris - die Ansicht, daß bei der congenitalen Hypoprothrombinämie eine Dysprothrombinämie vorläge und kein wirklich erniedrigter Prothrombinspiegel.

G. ENZYMATISCHE WIRKUNGEN VON KOAGULASE PLUS AKTIVATOR

Unterwirft man das Koagulase - C.R.F. - Gerinnungssystem biochemischen und enzymatischen Analysen, mit deren Hilfe man die Wirkung von Thrombin auf Fibrinogen studiert hat, so findet man verschiedene Ähnlichkeiten:

- 1) Beide Gerinnungssysteme zeigen Esterase - Aktivität auf ein synthetisches Substrat: "N-toluene-p-sulfonyl-L-arginine methyl-Ester" (TAME).
- 2) Wie Thrombin wird Koagulase-C.R.F. in seiner Fibrinogen-Gerinnung und TAME-Esterase-Aktivität durch Diisopropylfluorophosphat (DFP) gehemmt, bleibt aber unberührt von Sojabohnen-Trypsin-hemmer (SBTI).
- 3) Beide Systeme bewirken Gerinnung mit einer einleitenden Proteolyse. Dabei erfolgt in beiden Fällen ein Anwachsen des Reststickstoffes um ungefähr 3 %.
- 4) Bei der physiologischen Gerinnung werden 3 Fibrinopeptide gebildet E, A und B. Im Vergleich dazu gelang es, bei der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin durch das Koagulase - C.R.F. - System 4 Peptide zu trennen: E, A₁, A₂ und B. Durch weitere Untersuchungen wurde festgestellt, daß Peptid A₂ kein spezifisches Produkt war, sondern entweder ein ungereinigter Bestandteil der Ausgangsreagentien oder ein Ergebnis der Wirkung von teilweise gereinigtem C.R.F. auf Fibrinogen war.

Die Untersuchung mit der Ultrazentrifuge ergab folgendes Bild:

Ultrazentrifugal analyses of coagulase-C.R.F.-induced and thrombin-induced fibrino-peptides

Peptide	S ₂₀ (X 10 ⁻¹³) ^x	Mol wt
Coagulase-C.R.F. E	0.50	- +
Thrombin E	-†	- †
Coagulase-C.R.F. A ₁	0.45	- +
Coagulase-C.R.F. A ₂	0.41 - 0.48	- +
Thrombin A	0.52	2.000
Coagulase-C.R.F. B	0.56 - 0.59	- +
Thrombin B	0.56	2.400

^xSedimentation constant values of coagulase - C.R.F. - peptides were calculated on 0,5 to 1 % protein concentration in 0,1 M ammonium-acetate (pH 4,8). Values for thrombin peptides as (S ') from Gladner et al. (1959).

+Insufficient material for determination

†Not reported (DRUMMOND + TAGER 1963)

Die Endgruppenanalyse zeigte, daß Peptid A₁, A₂ und E als einzige N-terminale Aminosäure Glutaminsäure besaßen, während Peptid B keine besaß. Battleheim (1956) hatte bereits nachgewiesen, daß die Fibrinopeptide A von Thrombin katalysiert ebenfalls als einzige N-terminale Aminosäure Glutaminsäure enthielten, das Fibrinopeptid B dagegen keine, während die Natur des Peptids E noch ungeklärt war.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß bei der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin kein großer Unterschied darin besteht, ob die Reaktion durch Koenzym C.R.F. oder durch Thrombin katalysiert wird. (DRUMMOND und TAGER 1962, 1963, TAGER und DRUMMOND 1965)

H. BEDEUTUNG DER KOAGULASE

Die Bedeutung der Koagulase bei der St.-Infektion ist stark umstritten.

Schon GROSS (1933) versuchte - entsprechend der Eigenschaft der Koagulase, in vitro ein Koagulum zu bilden - auch in vivo eine Koagulation nachzuweisen. Er benutzte dazu die - allerdings abgebundene - Jugularvene des Kaninchens und konnte durch die Koagulase eine Thrombenbildung erzeugen. Er glaubte, damit eine mögliche Ursache der Thrombose staphylokokkenkranker Patienten gefunden zu haben.

Erst SMITH und JOHNSTONE (1956, 1958) greifen in ihren Versuchen dieses Problem wieder auf. Sie injizierten Kaninchen 2-5 mgr Koagulase und stellten danach einen steilen Abfall der Fibrinogenwerte fest. Das Absinken verlief proportional der injizierten Koagulasemenge. Die Fibrinogenwerte betrugen nach 30 min nur noch 15-40 % des ursprünglichen Wertes. Die Globuline waren ebenfalls vermindert. Allerdings kam es schnell zu einer Rückbildung der Fibrinogenwerte, die nach dem 2. und 3. Tag doppelt so hoch wie die Ausgangswerte waren. Nach einer Woche waren die Normalwerte wieder erreicht. Wurden den Kaninchen dagegen 10 mgr Koagulase injiziert, so trat der Tod der Tiere in 10-20 min ein. Im mikroskopischen Bild zeigten sich weitverbreitete Ablagerungen - vor allem in der Lunge, aber auch in Leber, Niere und Nebenniere -, die parallel zueinander in der Längsrichtung der Gefäße lagen und Fibrin-Färbereaktion gaben.

Auch BLOBEL und BERMAN (1961) berichten, daß bei Tieren, denen sie höhere Dosen Koagulase injizierten, die Pulmonal-Capillaren und Venolen von einem unorganisierten Thrombus blockiert wurden. Sie interpretierten dies Koagulum aber als ausgefälltes Protein, und nicht als wahres Fibringerinnsel. Das Vorhandensein von Koagulase im ausgefällten Material konnte nachgewiesen werden. Das gleiche Absinken der Fibrinogenwerte wurde nicht beobachtet, wenn die Kaninchen vorher gegen Koagulase hyperimmunisiert waren.

Nach Ansicht von Blobel und Berman ist es - auf der Grundlage dieser Beobachtungen - denkbar, die Koagulase als Ursache des starken Proteinabfalles anzusehen.

Effect of intravenous injection of coagulase on blood protein levels

No. of Rabbit	Dose (mgr)	<u>Before Exposure</u>		<u>30 min after Exp</u>	
		Total protein	Fibrinogen	Total prot.	Fibrinogen
40	50	72	4.12	60	0.75
40	40	74	3.61	52	0.29
43	30	69	3.44	51	0.48
44	20	76	3.87	56	0.69

Lethal Dose In mg/ml plasma
(BLOBEL + BERMAN 1961)

Andere Autoren sehen dagegen die Bedeutung der Koagulase-aktivität in einem Schutzmechanismus der St. gegen Phagocytose.

HALE und SMITH (1945) führten ihre Versuche in vitro durch. Ihre Experimente weisen daraufhin, daß im frühen Stadium der Entzündung ein Fibrinmantel um die St. gelegt sein mag, der sie so lange vor der Phagocytose schützt, bis andere Faktoren die Entwicklung der St.- Läsion gewährleisten. Die Hemmung der Phagocytose konnte - nach Zugabe von Aktivator-substanz - auch bei den Stämmen, die sonst nicht koagulierten, gezeigt werden. 1947 führten SMITH und HALE diese Versuche in vivo durch und sie waren auch dann der Ansicht, daß die Koagulase ein wichtiger Faktor bei dem Beginn der St.-Infektion sei, da sich die Keime - durch einen Fibrinmantel geschützt - ungehemmt im Organismus ausbreiten können.

BOAKE (1956) ordnet die Koagulase dem Angriffsmechanismus der St. zu. Er konnte durch Inhibitoren, die er über eine Immunisierung der Kaninchen gewonnen hatte, die Virulenz der pathogenen St. vermindern. Diese Abnahme der Virulenz wurde nicht durch α -Antitoxin oder St.-Agglutininierungs-Serum bewirkt.

EKSTEDT, YOTIS und NUNGESTER folgern andererseits aus ihren Versuchen, daß die Koagulase gewisse bakteriostatische Substanzen des Serums ausschaltet, und es so den St. ermöglicht wird, im Organismus ungestört zu wachsen. Dieser antibakterielle Serumfaktor, der in einer wasserlöslichen Globulin-Fraktion lokalisiert ist und nicht spezifisch wirkt, wurde 1956 von EKSTEDT dargelegt:

Der Serumfaktor verändert die empfänglichen Zellen durch Kontakt derart, daß sie unfähig zur Vermehrung sind. Koagulase scheint diesen Faktor zu inaktivieren, so daß Koagulasepositive St. - und nach Zugabe von Koagulase - auch K.-negative im normalen

menschlichen Serum sehr gut wachsen können. Vielleicht vermag die Koagulase auch eine physikalische Barriere zu setzen, die die Reaktion des Serumfaktors mit seinen Substraten in den Zellen verhüten kann.

YOTIS und EKSTEDT (1959) stellten fest, daß die Koagulase-positiven St. im menschlichen Serum auch viel aktiver atmen als die K.-negativen. Um ihren O_2 -Verbrauch zu unterbinden, ist eine Konzentration des Serumfaktors nötig, die 8-mal größer ist als die, die benötigt wird, um K.-negative Stämme an der Atmung zu hindern. Eine Anregung der Atmung erfolgt durch gereinigte Koagulase, dabei werden K.-negative St. 2-mal so stark angeregt wie K.-positive.

Der unterstützende Beweis der Koagulase-Tätigkeit liegt in Experimenten in vivo. So wurde gezeigt, daß die Virulenz der K.-negativen Stämme stark erhöht wurde, wenn sie vor der intracerebralen oder intraperitonealen Injektion bei Mäusen in gereinigter Koagulase suspendiert wurden (EKSTEDT und YOTIS, 1960). Es kam zu einer deutlichen Sterblichkeit der Tiere, während die gleiche Dosis der St. oder der Koagulase allein unschädlich war. Die K.-negativen Stämme wurden also durch Adsorption der Koagulase vor den natürlichen Schutzmechanismen des Wirtes geschützt.

Enhancement of mouse virulence of coagulase negative
staphylococcal strains by coagulase

Expt. No	Strain No	No of Animals	Inoculum	Per cent of Mortali ty after		
				3	7	14 days
1	141	20	2.3 x 10	10	28	43
2	141	14	1.2 x 10	14.3	21.4	50
3	111	11	3.2 x 10	0	27.4	37.3
4	111	19	2.7 x 10	33	44.4	55.5
5	117	8	2.3 x 10	50	50	50
Mean			2.34x10	21.4	34.0	47.2
Cell control		5 in each experiment	Same as above	0	0	0
Coagulase control		5 in each experiment	--	0	0	0

(EKSTEDT und YOTIS 1960)

J. PRODUKTION DER KOAGULASE

Über die Biosynthese und die Art der Abgabe der Koagulase ist nur sehr wenig bekannt.

DAVIES (1951) fand einen "pepsin-sensitive" Faktor; nach dessen Zugabe zum Nährboden kam es zu einem sehr starken plötzlichen Freilassen von Koagulase. Der Faktor ist in Kaninchen- und anderen Sera, auch im Eidotter enthalten.

JACHERTS (1957) entwickelte ein "Minimalmedium", das bestimmte Bestandteile in einer ganz bestimmten Konzentration enthielt. Wurde nur ein Faktor weggelassen, so unterblieb die Koagulasebildung. Für jeden St.-Stamm fand er einen anderen Nährboden, der sowohl die Koagulasebildung als auch die Zellteilung der Keime erlaubte. Wurde die Koagulase von der Keimoberfläche mit Trypsin verdaut, so wurde der Verlust an Koagulase zeitlich vor der Zellteilung ausgeglichen. Erst nachdem die Koagulase wieder auf der Keimoberfläche nachweisbar war, konnte eine Zellteilung beobachtet werden.

1958 fand JACHERTS weiter, daß die Koagulasebildung durch kernäquivalente Stoffe festgelegt und geregelt wird: Zellfreie Extrakte von St. - versetzt mit verschiedenen Konzentrationen von Desoxyribonuklease und eine Stunde lang einer Temperatur von 37°C ausgesetzt - bildeten nach Zugabe eines Vollmediums keine Koagulase mehr. Ribonuklease hatte keinen Einfluß auf die Koagulasebildung. Wurden dagegen die zellfreien St.-Extrakte mit Desoxyribonuklease + Vollmedium + Nukleinsäuregemisch versetzt, so wurde

Koagulase direkt proportional der zugegebenen DNS-Menge gebildet, während RNS die Koagulasebildung hemmten. Daraus schloß JACHERTS, daß möglicherweise durch Zugabe von RNS das Verhältnis DNS - RNS so ungünstig geworden war, daß keine Koagulasebildung mehr stattfinden konnte.

Daß die St. 10-mal mehr Koagulase abgaben, wenn sie in einem Medium wuchsen, das Säugetier-Albumin enthielt, war schon 1954 von DUTHIE festgestellt worden. ALTENBERN (1966) bestätigte diese Tatsache. Er glaubt, daß die Koagulase in der Zellperipherie synthetisiert würde und daß sie dort auch gebunden sei. Die Einverleibung in die Zellperipherie sei antagonistisch zu Albumin, so daß es nach Hinzufügen von Albumin zum Nährboden zu einem sofortigen Freilassen der Koagulase käme. Weiter fand ALTENBERN: 1.) die Abgabe der Koagulase von wachsenden St.-Stämmen ist sehr pH-empfindlich, das zellige Wachstum wird dagegen von pH-Schwankungen nicht beeinflusst. 2) geringe Konzentrationen von Chloramphenicol, die das Wachstum der Zellen nicht behindern, verhüten jede Abgabe der Koagulase, stören aber nicht bei ihrer Synthese. Dieser Punkt spricht für die Bildung der Koagulase in der Zellperipherie, da Enzyme, die im Zellinnern gebildet werden, unempfindlich diesem Antibiotikum gegenüber sind.

TIRUNARAYANAN (1966) fand die Produktion der Koagulase durch Glukose und KHCO_3 angeregt, und zwar am stärksten bei einer Konzentration von 0,5 - 1 % und bei pH-Werten von 7,3 - 7,9 sowohl in "Nutrient Broth" als auch in "Casein-hydrolysed" Medium.

MARSTON und FAHLBERG (1960) konnten in der Anwesenheit von L-Glutaminsäure reichlich Koagulase gewinnen. Vielleicht ist diese Säure der Schlüssel zur Synthese der Koagulase.

K. ZUSAMMENFASSUNG

Die Wirkung der Staphylokokken - Koagulase, die gereinigt elektröphoretisch homogen ist und 15 % Stickstoff enthält, erfolgt nur in Gegenwart eines Aktivators. Möglicherweise ist dieser "Coagulase - Reacting - Factor" identisch mit einer inaktiven Prothrombinform, die durch klassische Methoden nicht sichtbar gemacht werden kann.

Die Bedeutung der Koagulase liegt:

1. in einem steilen Abfall der Fibrinogenwerte
2. in einem Schutzmechanismus der Staphylokokken vor der Phagocytose und
3. im Ausschalten gewisser bakteriostatischer Substanzen.

L. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALTENBERN, R.A.: "On The Nature Of Albumin-Promoted Coagulase Release By Staphylococcus Aureus" J.Infect. Dis. 116:593-600 (1966)
2. BLOBEL, H., BERMAN, D.T., SIMON, J.: "Purification Of Staphylococcal Coagulase" J.of Bact. 79:807-815 (1960)
3. BLOBEL, H., BERMAN, D.T.: "Further Studies On The In Vivo Activity Of St. - Coagulase": J.Infect.Dis. 108:63-67 (1961)
4. BOAKE, W.C.: "Antistaphylocoagulase In Experimental St. - Infections" J. of Immun. 76:89 (1956)
5. CADNESS-GRAVES, B.: "Slide-Test For Coagulase-Positive-St." Lancet 244:736 (1943 I)
6. DARANYI, J.: "Pathogenität und Einteilung der Staphylokokken" Zbl.f.Bakt. I, Abt.Orig. Bd. 99:74 (1926)
7. DARANYI, J.: "Über den Nachweis der Pathogenität der St." Zbl.f.Bakt.I, Abt.Orig.Bd.134:13 (1935)
8. DAVIES, G.E.: "Factors Influencing The In Vitro Production Of St. - Coagulase" J.Gen. Microbiol. 5:687-697 (1951)
9. DRUMMOND, M.C., TAGER, M.: "Enzymatic Activities Associated With Clotting Of Fibrinogen By Staphylocoagulase And Coagulase-Reacting-Factor And Their Inhibition Through Diisopropylfluorophosphate" J.of Bact. 83:975-980 (1962)

10. DRUMMOND, M.C., TAGER, M.: "Fibrinogen-Clotting And Fibrinopeptide Formation By Staphylocoagulase And The Coagulase-Reacting-Factor" J.of Bact. 85:628-635 (1963)
11. DUTHIE, E.S.: "Variation In The Antigenic Composition Of St. - Coagulase" J.Gen. Microbiol. 7:320-326 (1952)
12. DUTHIE, E.S., LORENZ, L.L.: "St. - Coagulase: Mode Of Action And Antigenicity" J.Gen.Microbiol. 6:95-107 (1952)
13. DUTHIE, E.S.: "Evidence For Two Forms Of St. - Coagulase" J.Gen.Microbiol. 10:427-436 (1954)
14. DUTHIE, E.S.: "The Production Of Free St. - Coagulase" J.Gen.Microbiol. 10:437-444 (1954)
15. EKSTEDT, R.D., NUNGESTER, W.J.: "Coagulase In Reversing Antibacterial Activity Of Normal Human Serum Of M. Pyogenes" Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 89:90-93 (1955)
16. EKSTEDT, R.D.: "The Effect Of Coagulase On The Antibacterial Activity Of Normal Human Serum Against Selected Strains Of M. Pyogenes" Ann.N.Y.Acad.Science 65: 119-131 (1956)
17. EKSTEDT, R.D.: "Further Studies On The Antibacterial Activity Of Human Serum By M. Pyogenes And Its Inhibition By Coagulase" J.of Bact. 72:157-161 (1956)

18. EKSTEDT, R.D., YOTIS, W.W.: "Studies On
Staphylococci II. Effect Of Coagulase
On The Virulence Of Coagulase Negative
Strains" J.of Bact. 80:496-500 (1960)
19. GERHEIM, E.B., FERGUSON, H.J., TRAVIS, B.L.:
"Activation Of Staphylocoagulase" Proc.
Soc.Exper.Biol.Med. 66:525-527 (1947)
20. GORRILL, R.H., KLYK, K.M., MC.NEIL, E.M.: "The
Initiation Of Infection In The Mouse
Kidney After Intravenous Injection Of
Bacteria" J.Path.Bact. 91:157-172 (1966)
21. GROSS, H.: "Über Virulenz und Virulenz-Prüfungs-
methoden von St." Klin.Wschr.Nr. 48:
2281 (1927)
22. GROSS, H.: "Zur Biologie der St." Z.f.Immun.-For-
schung Bd. 59:510 (1928)
23. GROSS, H.: "Über St.-Fermente" Zbl.Bakt.Orig.108:
(1928)
24. GROSS, H.: "Der Plasmagerinnungsstoff der St."
Zbl.Bakt.Orig. 122:354 (1931)
25. GROSS, H.: "Fermente und Giftstoffe der St."
Ergeb.Hyg.Bd. 13:516 (1932)
26. HALE, J.H., SMITH, W.: "The Influence Of Coagulase
On The Phagocytosis Of St." Brit.J.Exp.
Path. 26:209-216 (1945)
27. HAUGHTON, G., DUTHIE, E.S.: "Activation Of St.-
Free Coagulase By Purified Human
Prothrombin" Nature 184:116 (1959)
28. ILLES, J.: "Koagulasewirkung auf Rinderplasma"
Patholog.Microbiol. 26:225-236 (1963)

29. ILLES, J.: "Der Koagulasegehalt des Meerschweinchenplasmas und die Hitzeresistenz des Aktivators" Pathol.Microbiol. 28: 834-838 (1965)
30. JACHERTS, D.: "Zur Reindarstellung der Staphylokoagulase" Z.f.Hyg.Bd. 142: 213-218 (1956)
31. JACHERTS, D.: "Experimentelle Untersuchungen über die Identität freier und gebundener Koagulase" Z.f.Hyg. 142:502-509 (1956)
32. JACHERTS, D.: "Untersuchungen über den Koagulase-stoffwechsel der pathogenen St." Z.f.Hyg. 144:99 (1958)
33. JACHERTS, D., JACHERTS, Bl.: "Über die Beeinflussung der Koagulasebildung durch Nukleinsäuren" Z.f.Hyg. 144:389-400 (1958)
34. KAPLAN, M.H., SPINK, W.W.: "Studies On The Staphylocoagulase Reaction: Nature And Properties Of A Plasma Activator And Inhibitor" Blood 3:573 (1948)
35. KAPRAL, F.A., LI, W.: "Virulence And Coagulases Of St.-Aureus" Proc.Exp.Biol.Med. 104:151-153 (1960)
36. KEMKES, B.: "Plasmakoagulase und Pathogenität der St." Zbl.Bakt.Orig.Bd. 109:11 (1928)
37. KLEINSCHMIDT, H.: "Fibrinbildende und -auflösende Wirkung von St." Z.Immun.-Forschung 3: (1909)
38. LOEB, L.: "Influence Of Certain Bacteria On The Coagulation Of Blood" J.Med.Research 5:407 (1903)

39. LOMINSKI, J., ROBERTS
J.Path.Bact. 58:187-197 (1946)
40. LOMINSKI, J.: "Susceptibility And Resistance To
St.-Infection" J.of Gen.Microbiol.
3:9 (1948)
41. MARSTON, J., FAHLBERG, W.J.: "Coagulase-Production
By St.-Aureus II. Groth And Coagulase-
Production In Complex And Chemically
Defined Mediums - Comparison Of
Chemically Defined Mediums" J.Infec.Dis.
106:116-122 (1960)
42. MARGET, W., TRATNIK, L.: "Coagulase-reacting-factor
und Antikoagulase bei Neugeborenen und
beim Säugling" Z.f.Kinderkr. 84:244-247
(1960)
43. MIALE, J.D.: "I. The Reaction Of Staphylocoagulase
With Coagulase-Globulin (CG) To Form
Coagulase-Thrombin (CT)" Blood 4:1039
(1949)
44. MUCH, H.: "Über eine Vorstufe des Fibrinfermentes
in Kulturen von St.-Aureus" Biochem.Zeit-
schrift 14 (1908)
45. MURRAY, M., GOHDES, P.: "Purification Of St.-
Coagulase" Biochem.Biophys.Acta 40:518-
522 (1960)
46. RAMMELKAMP, CH., BADGER, G.F., DINGLE, J.H.,
FELLER, A.E., HODGES, R.G.: "Antigenicity Of Cell-
Free St. Coagulase" J.Infect.Dis. 86:
159 (1950a)
47. RAMMELKAMP, CH., HASEBUCKS, M.M., DINGLE, J.H.:
"Spezific Coagulases Of St. Aureus"
J.Exptl.Med. 91:295 (1950b)

48. RAMMELKAMP, CH., LEBOWITZ, J.L.: "The Role Of Coagulase In St. Infections" Ann.N.Y. Acad.Science 65:144 (1956)
49. RIGDON, R.H.: "Failure Of Heparins To Inhibit Coagulation Of Citrated Blood And Plasma In Presence Of St." Proc.Soc.Exptl.Biol. Med. 50:324 (1942)
50. RUBINSTEIN, H.M.: "Studies On The Mechanism Of Action Of Staphylocoagulase" Brit.J. Haematol. 4:326 (1958)
51. SMITH, W., HALE, J.H.: "The Nature And Mode Of Action Of St. Coagulase" Brit.J.Exptl. Path. 25:101-109 (1944)
52. SMITH, W., HALE, J.H., SMITH, M.M.: "The Role Of Coagulase In St. Infections" Brit.J. Exptl.Path. 28:57-67 (1947)
53. SMITH, D.D., JOHNSTONE, J.M.: "Coagulase - Activity In Vivo" Nature 178:982 (1956)
54. SMITH, D.D., JOHNSTONE, J.M.: "Staphylocoagulase Activity In Vivo" Brit.J.Exptl.Path. 39:165-170 (1958)
55. SOULIER, J.P., PROU-WARTELLE, O.: "ÉTUDE Comparative Des Taux De Cofacteur De La Staphylocoagulase (C.R.F.) Et Des Taux De Facteur II (Prothrombin) Dans Diverses Conditions" Nouv.Rev.Franc.Hématol. 6:623-636 (1966)
56. TAGER, M., HALE, H.: "Studies On The Coagulase-Reacting-Factor II. Properties Of C.R.F. And Relation To Blood Clotting Components" J.Immunol. 60:1 (1948)

57. TAGER, M., HALES, H.: "The Experimental Production Of Antibodies To Staphylocoagulase" J.Immunol. 60:475 (1948)
58. TAGER, M.: "Concentration, Partial Purification, Properties, And Nature Of Staphylo-coagulase" Yale J.Biol.Med. 20:487 (1948a)
59. TAGER, M.: "Differences In The Resistance Of Human Plasmas To Staphylocoagulase" Yale J. Biol.Med. 21:9 (1948b)
60. TAGER, M.: "Problem In The Coagulation Of Plasma By Staphylocoagulase" Ann.N.Y.Acad.Science 65:109 (1956)
61. TAGER, M.: "Studies On The Nature And The Purification Of The C.R.F. And Its Relation To Prothrombin" J.Exptl.Med. 104:675 (1956)
62. TAGER, M., DRUMMOND, M.C.: "Staphylocoagulase" Ann. N.Y.Acad.Science 128:92-111 (1965)
63. TIRUNARAYANAN, M.O.: "Investigations In The Enzymes And Toxins Of St." Acta Path.Microbiol. Scand. 68:273-280 (1966)
64. YOTIS, W.W., EKSTEDT, R.D.: "Studies On St. I.: Effect Of Serum And Coagulase On The Metabolism Of Coagulase-Positive And Coagulase-Negative Strains" J.Bact. 78:567-574 (1959)
65. ZOLLI, Z.: "Purification And Charakterization Of Staphylocoagulase" J.Bact. 86:527-535 (1963)

LEBENS LAUF

Am 15.3.1943 wurde ich, Meike Wohlers, als Tochter des prakt. Arztes Dr. med. Heinz Wohlers und seiner Ehefrau Ilse Wohlers, geb. Müller, in Oldenburg geboren. Ich besuchte 4 Jahre die Volksschule und anschließend das Gymnasium in Nordenham, an dem ich 1962 das Reifezeugnis erwarb.

Mit dem Studium der Zahnmedizin begann ich im Sommersemester 1962 in Freiburg/Br. Hier bestand ich im Herbst 1964 die zahnärztliche Vorprüfung. Meine klinische Studienzeit, die ich in München absolvierte, beschloß ich im Sommer 1967 mit dem Staatsexamen.

